

MEDICINSKI CENTAR U ZAJEČARU, SLUŽBA ZA NUKLEARNU MEDICINU

RADIORECEPTORSKI TEST ZA TIREOTROPIN – PRIPREMA I TESTIRANJE KOMPONENTI

Paunković N., Miladinović J., Nikolić K.

UVOD

Radioreceptorski test predstavlja in vitro model za testiranje hormonskih receptora. Za njegovo izvođenje potrebne su sledeće komponente: preparacija receptora, »obeleženi« (radiojodirani) hormon i neradioaktivni hormon (1). Osnovni uslov za funkcionisanje ovog modela je da su sve komponente biološki suficijentne (za razliku od radioimunog testa gde je dovoljna imunološka aktivnost sastojaka). Radioreceptorassay se primenjuje za testiranje: 1. receptora u tkivima (broj i afinitet), 2. autologih hormona (vezivanje na receptore), 3. heterolognih hormona (»spillover« fenomen), 4. antireceptorskih antitela, 5. biološke efikasnosti raznih hormonskih preparacija, itd (1,2,3,4).

Radioreceptorski test za TSH se danas najčešće primenjuje za testiranje autoantitela na receptore za TSH (TSI, TIAb, TGI) a redje za ispitivanje receptora u tkivu štitnjače (5,6,7,8). Dokazivanje antireceptorskih antitela predstavlja veoma koristan test za dijagnozu, kontrolisanje i prognozu obolelih od Bazedovljeve bolesti (5,8,9). Bilo bi neophodno da se i on rutinski izvodi, za šta je potrebno da se raspolože jednostavnim i relativno jeftinim kompletima reagenasa, što za sada nije slučaj.

Cilj ovog ispitivanja bio je testiranje nama dostupnih komponenti, kao i pokušaj izvođenja radioreceptorskog testa uobičajenim postupcima.

Predmet rada bio je: priprema membrana tireocita, provera biološke aktivnosti (vezivanje na receptore) raspoloživih obeleženih preparacija TSH, i ispitivanje »inhibicionog« delovanja raspoloživih terapijskih preparata sa tireotropnim dejstvom. Posebna pažnja je posvećena preparaciji tireocitnih membrana, budući da su za to potrebni posebni aparati (mašine za seckanje tkiva, homogenizatori, ultracentrifuga) i postupci (zamrzavanje u tečnom azotu, separacija na gradijentu sukroze, itd)(8,10,11).

MATERIJAL I METODA

a) Pripremanje komponenti: 1. Priprema tireocitnih membrana – štitnjača je uzimana u toku tireoidektomije bolesnika od Bazedovljeve bolesti, pri čemu je odmah potapana u ledeno ohladjen Tris-HCl-BSA pufer pH 7,4). Odvajanje od vezivnog i masnog tkiva skalpelom vršeno je odmah nakon toga na ledu, a seckanje tkiva obavljeno je u komercijalnom mikseru za domaćinstvo. Posle filtriranja macerata kroz četvoroslojnu gazu i dopunjavanja istim puferom, vršeno je prvo centrifugovanje na 800 obrtaja, a zatim centrifugovanje supernatanta na maksimalnoj brzini uobičajene laboratorijske centrifuge (oko 7.000 obrtaja u min), 30 minuta na sobnoj temperaturi. Uziman je gornji sloj precipitata, razredjen puferom i zamrznut na -20°C do testiranja. 2. Ispitivanje komercijalnog ^{125}I TSH iz radioimunološkog kompleta za određivanje TSH (INEP-Zemun) i za ovu priliku obeleženog (IBK-Vinča, Mila Ratković) TSH

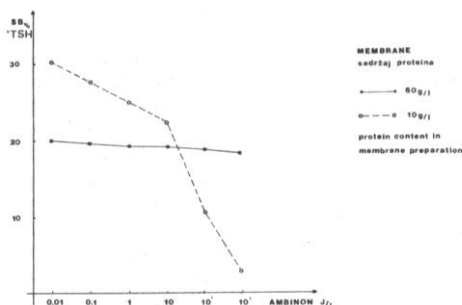
(Calbiochem) koji je takodje za RIA namene. 3. Ispitivanje komercijalnog terapijskog preparata sa tireotropnim delovanjem, Ambinon (Organon).

b) Radioreceptorski test je izvodjen po nešto modifikovanom postupku koji koristi TRAK-Assay (Henning) za detekciju receptorskih TSH autoantitela (9). Ukratko: preparacija membrana tireocita inkubira se sa ^{125}I tireotropinom uz dodatak rastućih koncentracija neradioaktivnog hormona, na temperaturi od 37°C u toku 60 min. Nakon inkubacije vrši se separacija »receptorske faze« dodavanjem hladnog 10% PEG i centrifugovanjem na oko 4.000 obrtaja/min, u toku 20 min na sobnoj temperaturi. Testirane (»naše«) komponente smo ubacivali u komercijalni TRAK-assay radi poređenja. Budući da smo odmah potvrdili dobru »inhibicionu« aktivnost Ambinona, to smo njega često koristili kao neaktivni ligand, umesto odgovarajućih »standardnih« preparacija iz TRAK-assay.

REZULTATI

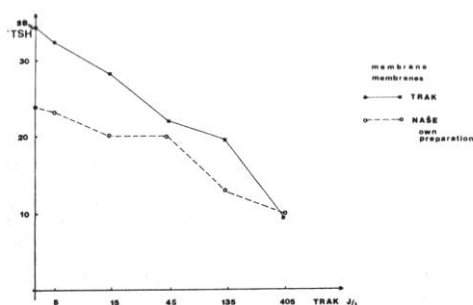
Rezultate radioreceptorskog testa smo predstavili na »inhibicionoj krivulji«: procenat specifičnog vezivanja (SB%) obeleženog TSH u funkciji promenljivih »inhibitornih« koncentracija neradioaktivnih TSH preparacija.

Kvalitet tireocitnih membrana koje smo pripremili u zavisnosti od njihove koncentrovanosti (merene u koncentraciji ukupnih proteina) – najbolju rezultati se dobijaju ako je ova koncentracija oko 10 g/l ukupnih proteina (slika 1).



Slika 1 — Uticaj koncentracije membranske preparacije na specifično vezivanje obeleženog TSH

Fig. 1 — Influence of concentration of membrane preparation on TSH specific binding



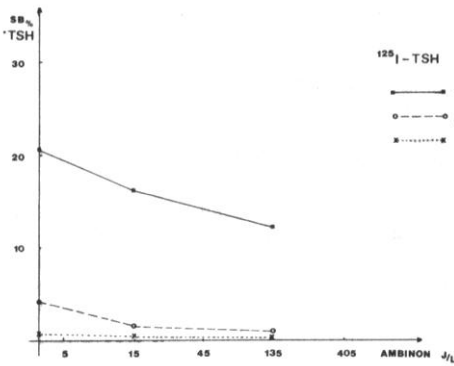
Slika 2 — Radioreceptorski test za TSH: ispitivanje membrana tireocita

Fig. 2 — Radioreceptorassay for TSH: Thyrocyte membrane testing

Uporedne vrednosti radioreceptorskog testa komercijalnim preparacijama membrana tireocita (TRAK) i »našim«, prikazane su na slici 2.

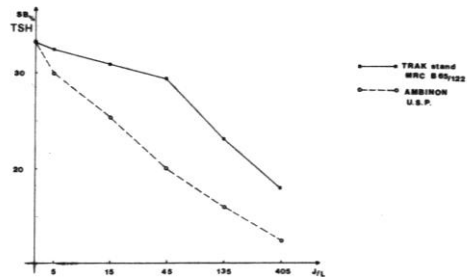
Membranska preparacija dobijena našim postupkom, čuvana zamrznuta na -20°C , održava zadovoljavajući kvalitet oko 40 dana (dokazano na četiri ovakve preparacije). Ni visoko kvalitetni TRAK-assay, čije su membrane solubilizirane i liofilizirane, nije se u ovom testiranju pokazao dugotrajnijim.

Kvalitet ispitivanih preparacija »obeleženi« TSH (INEP, Calbiochem) bio je znatno ispod referentnog TSH (TRAK) koji je pripreman za radioreceptorsku primenu (slika 3).



Slika 3 — Radioreceptorski test za TSH: ispitivanje obeleženog hormona

Fig. 3 — Radioreceptorassay for TSH: Labelled hormone testing



Slika 4 — Radioreceptorski test za TSH: ispitivanje neobeleženog hormona

Fig. 4 — Radioreceptorassay for TSH: Unlabelled hormone testing

Najzad, neradioaktivna komponenta sistema koja u radioreceptorskom testu služi za »inhibiciju« vezivanja obeleženog hormona na receptore, na osnovu našeg ispitivanja sa uspehom bi mogla da bude lek sa tireotropnim delovanjem, Ambinon (slika 4).

DISKUSIJA

Testirali smo komponente koje ulaze u sastav radioreceptorskog testa za TSH. Posebno su ispitane preparacije membrana tireocita jer su iste proizvedene u našoj laboratoriji. Ocena njihovog kvaliteta ukratko je sledeća: pripremljene na opisani način membrane ispoljavaju dovoljno visoko specifično vezivanje obeleženog TSH. Međutim, inhibiciona krivulja u opsegu niskih koncentracija neobeleženog hormona nema dovoljan pad, što znači da bi test bio nedovoljno osetljiv u tom opsegu. Ovo je znatan ograničavajući činilac ako bi se test koristio za detekciju antireceptorskih antitela, jer su ona najčešće prisutna u tim nižim inhibitorskim koncentracijama.

Preparacija obeleženih TSH koje se nalaze na našem tržištu za primenu u RIA postupcima ne zadovoljavaju za potrebe u radioreceptorskom testiranju. Neophodno bi bilo nabaviti biološki aktivne preparacije bovinog TSH i obeležiti ih specifičnijim (laktoperoksidaza) metodama (10). Komercijalni preparat sa tireotropnim delovanjem, Ambinon (Organon), mada nije visoko prečišćen preparat TSH, pokazao se kao vrlo receptorski aktivan i pogodan za primenu u vidu »inhibitorne« komponente radioreceptorskog sistema.

Mada ovaj naš rad nije imao za rezultat dobijanje svih neposredno primenjivih komponenti radioreceptorskog testa za TSH, on je rešio brojne probleme. Dobili smo vrlo jednostavim postupkom tireocitne membrane osrednjeg kvaliteta. Odabrali smo dostupnu preparaciju neradioaktivne komponente. Rešili smo i druga metodološka pitanja (sastav inkubacionog pufera, najbolji procenat PEG-a, najadekvatniju koncentraciju membrana, itd) koja se najčešće ne pominju u uputstvima za rad komercijalnim priborima. Najzad, namera nam je da ovim saopštenjem skrenemo pažnju znatno opremljenijim institucijama od naše (nuklearni instituti, proizvođači radiofarmaka) na potrebu razvoja i proizvodnje ovog vrlo korisnog radioreceptorskog testa.

LITERATURA

- 1 Gorden Ph., Wintraub B. Radioreceptor and other functional hormone assays. In: Williams R.H. Textbook of Endocrinology, Grune&Stratton, New York, 1985; 133-146.
- 2 Kahn C.R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. J Cell Biol 1970; 70:261-286.
- 3 Paunkovic N., Miladinovic J. Inhibitorno dejstvo monokomponentnog insulina (Actrapid-Novo) na vezivanje obelezenog insulina na eritrocite u toku radioreceptorskog testa. Simpozijum: Moderna insulinska terapija, Ljubljana, 1985.
- 4 Roth J., Grunfeld C. Mechanism and action of peptide hormones and catecholamines, In: Williams R.H. Textbook of Endocrinology, Grune&Stratton, New York, 1985; 76-122.
- 5 Davies T.F. Diseases of TSH receptor. J Clin Endocrinol Metab 1983; 12:79-100.
- 6 Pinchera A. et al. Immunoglobulines thyreostimulantes. Antigenes corespondants. Ann Endocr (Paris) 1982; 43:534-547.
- 7 Smith B.R., Hall R. Thyroid-stimulating immunoglobulines in Graves' disease. Lancet 1974; 2:287-291.
- 8 Zakarija M., Garcia A., McKenzie J. Studies on multiple thyroid cell membrane-directed antibodies in Graves' disease. J Clin Invest 1985; 76:1885-1891.
- 9 Paunkovic N., Miladinovic J., Pavlovic O. Determination of anti-TSH receptor autoantibodies in different phases of Graves-Basedow disease. Nucl Med 1986; 25:29.
- 10 Carayon P., Guibout M., Lissitzky S. The interaction od radioiodinated thyrotropin with human plasma membranes from normal and diseased thyroid glands. Ann Endocr (Paris) 1979; 40:211-227.

Radiol Jugosl 1989;23:383-366.